Aus der Klinischen Abteilung des Diabetes
Forschungsinstituts, Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. F. A. Gries

WACHSTUM UND PROTEINSTOFFWECHSEL VON FIBROBLASTEN PRIMÄRER UND SEKUNDÄRER DIABETIKER

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Margret Caspari

1982

Aus der Klinischen Abteilung des Diabetes
Forschungsinstituts, Düsseldorf

Dierektor: Prof. Dr. F.A. Gries

Wachstum und Proteinstoffwechsel von Fibroblasten primärer und sekundärer Diabetiker

D I S S E R T A T I O N

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Margret Caspari
1982

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Hopf

Referent
gez.: Prof Dr. F.A. Gries

Koreferent
gez.: Prof. Dr. Dr. Pfitzer

Ich danke Herrn Prof. Dr. F.A. Gries für die Überlassung des Themas.
Herrn Dr. T. Koschinsky danke ich für die Betreuung bei der Arbeit.
Für die Bereitstellung der Zellen und die technische Unterstützung danke ich Frau Diplom Biologin C. Bünting.

Inhalt

1. Einleitung und Fragestellung 1
1.1. Bedeutung von Wachstumsänderungen 1
1.2. Proteinstoffwechsel 3

2. Methoden 4
2.1. Material 4
2.2. Seren 4
2.3. Fibroblastenkulturen 5
2.4. Messung des Fibroblastenwachstums und der Proteinsynthese. 5

3. Ergebnisse 7
3.1. Wachstum von Fibroblasten pankreatektomierter Diabetiker und Stoffwechselgesunder in Diabetikerserum und in Normalserum. 7
3.2. Proteinsynthese in Fibroblasten von Diabetikern und Stoffwechselgesunden: Einbau von ^{14}C-Leucin und ^{14}C-Prolin in Zellproteine. 8

4. Diskussion 10
4.1. Bedeutung zellulär fixierter Wachstumsänderungen. 10
4.2. Zellulär fixierte Wachstumsänderungen und die Bedeutung metabolischer Faktoren bei verschiedenen Tierspezies im Vergleich zum Menschen. 12
4.4. Änderungen der Proteinsynthese mesenchymaler Zellen. 15

5. Zusammenfassung 17

6. Anhang 19
6.1. Tabellen 1-7 19
6.2. Abbildungen 1-8 26
6.3. Literaturverzeichnis 34

Einleitung und Fragestellung

DerDiabetes mellitus gehört zu den häufigsten Erkrankungen in den hoch industrialisierten Ländern. Die Lebenserwartung der Diabetiker ist um 1/3 gegenüber Stoffwechselgesunden verkürzt und wird vor allem durch angiopathische Komplikationen bestimmt. Die Gründe für das Auftreten und die raschere Progression degenerativer Gefäßerkrankungen bei Diabetikern im Vergleich zu Stoffwechselgesunden sind noch weitgehend unbekannt.
Im Zusammenhang mit der diabetischen Makroangiopathie werden unter anderem als bedeutend angesehen: gesteigertes Wachstum von glatten Muskelzellen und vermehrte Ablagerung von extrazellulären Bindegewebssubstanzen wie Kollagen, elastische Fasern und Proteoglykane (1). Zur Erklärung der Pathogenese der Angiopathien beim Diabetes mellitus können daher Untersuchungen von Wachstum und Proteinstoffwechsel mesenchymaler bzw. vaskulärer Zellen von Diabetikern von Bedeutung sein.
Dazu werden in vitro Versuche mit mesenchymalen Zellen von Diabetikern in der Zellkultur durchgeführt. Dabei sind von Interesse:

1. in der Zellkultur persistierende zellassoziierte Änderungen, die mit Änderungen des Zellstoffwechsels einhergehen
2. das Auffinden von Serumbestandteilen mit Wirkung auf den Zellstoffwechsel.

Bedeutung von Wachstumsänderungen

Die Teilungsfähigkeit menschlicher Fibroblasten ist auf ca. 50 Zellverdopplungen beschränkt (2). Die

verbleibende Teilungsfähigkeit ist umgekehrt proportional zum Lebensalter des Spenders. Bereits vor dem Ende der Vermehrungsfähigkeit zeigen sich funktionelle und morphologische Änderungen, die als Ausdruck der Zellalterung angesehen werden (3,4). Ebenso ist bei Krankheiten, die als Modell für vorzeitiges Altern angesehen werden, wie das Hutchinson-Gilford- und das Werner Syndrom, die Zahl der Zellverdopplungen reduziert gegenüber altersgleichen Gesunden. Auch der Diabetes mellitus wird in Beziehung zur Zellalterung gebracht. So sind bei Fibroblasten von Diabetikern im Vergleich zu Fibroblasten Stoffwechselgesunder eine Verminderung der Zellteilungsfähigkeit, der Aussaateffizienz, der Zellzahl bei Konfluenz und eine verzögerte Verdopplungszeit beschrieben worden (5). Bereits an Fibroblasten von genetischen Prädiabetikern findet sich eine Einschränkung der Teilungsfähigkeit (6), was zur Annahme einer genetischen Prädisposition mit verändertem Wachstumsverhalten von mesenchymalen Diabetikerzellen führte. Das Wachstum von Fibroblasten primärer Typ I Diabetiker ist gegenüber dem Wachstum von Fibroblasten Stoffwechselgesunder gesteigert (22). Obwohl die Änderungen der Wachstumseigenschaften mesenchymaler Diabetikerzellen unabhängig von der Einwirkung extrazellulärer metabolischer Faktoren persistieren, bleibt offen, ob diese Wachstumsänderungen diabetesspezifisch sind, oder ob erst das Zusammenwirken einer genetischen Prädisposition der Zellen mit extrazellulären metabolischen Faktoren die Wachstumsänderungen manifest werden läßt. Untersuchungen an arteriellen glatten Muskelzellen von Ratten, Kaninchen und Minischweinen, bei denen experimentell arterielle Hypertension, Hyperlipoproteinämie oder Diabetes induziert wurde, unterstreichen die Bedeutung der Interaktion zellassoziierter Faktoren mit extrazellulären metabolischen Faktoren. Es zeigt sich eine erhöhte Proliferationsrate von Gefäßwandzellen

in vivo, die auch in der nachfolgenden Zellkultur über mehrere Passagen persistiert, wenn das extrazelluläre Milieu wieder vollständig normalisiert ist (7).

Zur Klärung der Bedeutung zellulär fixierter vererbbarer Faktoren für abnormes Wachstumsverhalten mesenchymaler Zellen beim Diabetes mellitus soll das Fibroblastenwachstum von pankreatektomierten Diabetikern ohne familiäre Diabetesbelastung (sDF) mit dem Fibroblastenwachstum von primären Diabetikern mit familiärer Diabetesbelastung (DF) und von Stoffwechselgesunden verglichen werden.

Proteinstoffwechsel

Mit dem Zellwachstum ist der Proteinstoffwechsel eng verknüpft, da die Proteinsynthese für den geregelten intrazellulären wie extrazellulären Funktionsablauf von entscheidender Bedeutung ist. Bei Fibroblasten primärer Typ I Diabetiker ist eine Steigerung der Proteinsynthese und der Kollagensynthese im Vergleich zu Fibroblasten Stoffwechselgesunder beschrieben worden (8). Ebenso wurde die Synthese und Sekretion abnormer Kollagenmoleküle und Glucosaminoglykane beschrieben (9).
Im Rahmen der Untersuchungen des abnormen Wachstumsverhaltens von Diabetikerfibroblasten verschiedener Genese erscheint es daher von Interesse, auch den Proteinstoffwechsel hinsichtlich seiner Abhängigkeit von zellassoziierten und metabolischen Faktoren zu untersuchen.

Methoden

Material

Zellinkubationsmedium: Dulbeccos Modifikation des Eagle'schen Minimalen Mediums (DME) (10). Dieses enthält 5 mM Glucose, Leucin 105 mg/l, Penicillin 50 E/ml, Streptomycin 50 µg/ml; phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung (PBS), Foetales Kälberserum, alles von Seromed GmbH, München. Trypsin EDTA Lösung 0,05% von Biocult GmbH, Karlsruhe. Falcon Zellkulturflaschen und Schalen von Becton & Dickinson, Heidelberg. L-^{14}C-Leucin (spezifische Aktivität 59 mCi/mmol), DL-^{14}C-Prolin (spezifische Aktivität 282 mCi/mmol) von Amersham Buchler GmbH, Braunschweig.

Seren

Venenblut von 10-15 Stunden nüchternen Diabetikern (NIDDM) und Stoffwechselgesunden, wurde bei 4°C 15 Minuten mit 1500 x g zentrifugiert, das Serum abpippetiert und bei -20° C bis zu 4 Wochen aufbewahrt. Die wachstumsstimmulierende Wirkung der Seren blieb während dieser Zeit unverändert. Es wurden verwendet:

1) 7 verschiedene Mischseren von je 10-15 mit Sulfonylharnstoffen behandelten Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung ohne Ketose. Letzte Sulfonylharnstoffeinnahme 12-15 Stunden vor Blutentnahme.
2) 7 verschiedene Mischseren von 6-10 Stoffwechselgesunden.

Die Konzentrationen von verschiedenen charakteristischen Bestandteilen dieser Seren sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Fibroblastenkulturen

Die Zellinien für die Kultur wurden in folgender Weise gewonnen: freiwilligen Versuchspersonen wurde in örtlicher Betäubung unter sterilen Bedingungen eine 3x3 mm große Hautbiopsie vom Oberarm entnommen. Diese wurde in phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS) gewaschen und mit einem Skalpell in ungefähr 20 Stücke geteilt. Je 2-3 dieser Stückchen wurden in einer Zellkulturschale (60 mm ⌀ =28,3 cm^2) mit einem Deckglas bedeckt, in 3 ml Medium (DME) + 10% fötales Kälberserum bis zur dritten Passage gezüchtet und anschließend unter kontrollierten Bedingungen eingefroren. Alle Zellinien wurden bei 37° C, 5% CO_2 und 95% angefeuchteter Luft gezüchtet. Der pH Wert in der Kultur lag unter diesen Bedingungen zwischen 7,2 - 7,4. Die verschiedenen Zellinien wurden von Frau Diplom Biologin Bünting, Klinische Abteilung des Diabetes Forschungsinstituts Düsseldorf, zur Verfügung gestellt. Klinische, für die Zellkultur potentiell relevante Daten von den Zellinien der primären- und sekundären Diabetiker und der Stoffwechselgesunden, sind in den Tabellen 2-4 zusammengestellt.

Messung des Fibroblastenwachstums und der Proteinsynthese

Zu Versuchsbeginn wurden 1 x 10^5 Fibroblasten pro Zellkulturschale (60 mm ⌀ = 28,3 cm^2) von je einem Diabetiker und einem altersgleichen Stoffwechselgesunden parallel angesetzt. Jede Schale enthält 3 ml Nährmedium (DME), dem 10% Normalserum oder 10% Diabetikerserum (v/v) zugesetzt wurden. Alle 2-3 Tage wurde Medium gewechselt. Die Versuche wurden bis zum Erreichen eines konfluenten Monolayerstadiums, in der Regel am 7.-10. Versuchstag durchgeführt.

Zu den Meßzeitpunkten wurden die Zellen mit 0,05% Trypsinlösung 3-4 Minuten unter lichtmikroskopischer

Kontrolle von den Plastikschalen ab- und aus dem Zellverband herausgelöst und im Coulter-Counter (Modell ZB I) dreifach pro Schale gezählt. Je Meßpunkt wurden die Zellzahlen von 4 Parallelschalen bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. Der Variationskoeffizient der Zellzahlbestimmung beträgt 1,7%. Der Variationskoeffizient für das Wachstum von am gleichen Tage unter gleichen Bedingungen getrennt angesetzten Zellen einer Zellinie beträgt während einer Wachstumsphase bis zu Konfluenz 3,3%. Der Gesamtproteingehalt pro Platte wurde nach Entfernung der Serumproteine von 2 Zellkulturschalen pro Meßpunkt nach Lowry (11) bestimmt (Variationskoeffizient 2,3%).
Der Wachstumsunterschied der Diabetikerfibroblasten zu den parallel gezüchteten altersgleichen Stoffwechselgesunden am jeweils letzten Versuchstag wurde mittels Student-t-Test auf Signifikanz geprüft.

4 Stunden und 20 Stunden nach Zugabe von ^{14}C-Leucin (0,25 µCi/ml) oder ^{14}C-Prolin (0,25 µCi/ml) wurde deren Einbau in Zellproteine in 3-4 Zellkulturschalen pro Meßpunkt bestimmt. Die Plastikschalen wurden auf Eis gekühlt. Nach Entnahme einer Probe (1,5 ml) des extrazellulären Mediums wurden die Zellen 6 mal hintereinander mit je 3 ml eiskalter PBS gewaschen und abtrypsiniert (0,05% Trypsin, 3-5 Min. 37°C). Die Medienprobe und die trypsinierten Zellen wurden mit eiskalter 50% Trichloressigsäure (0,5 ml/ml Probe) präzipitiert, zentrifugiert (2500 x g, 15 Min., 4°C), das Pellet wurde in 1 N NaOH aufgelöst und die in einer Probe enthaltene Radioaktivität gemessen.

Da die Proteinsynthese linear mit zunehmender Zelldichte/Platte abnahm, wurden die Meßergebnisse bei unterschiedlicher Konfluenz an Hand der Steigung der Regressionsgeraden auf gleiche Zelldichte umgerechnet, um die Ergebnisse verschiedener Versuche vergleichen zu können.

Ergebnisse

Wachstum von Fibroblasten pankreatektomierter Diabetiker und Stoffwechselgesunder in Diabetikerserum und in Normalserum.

Abbildung 1 zeigt das typische Wachstumsverhalten der Fibroblasten eines pankreatektomierten Diabetikers mit schlechter Stoffwechseleinstellung seit Diabetesbeginn (sDF2) im Vergleich zu Fibroblasten eines altersgleichen parallel gezüchteten Stoffwechselgesunden (NF4). Die Fibroblasten des pankreatektomierten Diabetikers wachsen vom 5.-10. Versuchstag um 60-160% schneller als die Fibroblasten des Stoffwechselgesunden. Diabetikerserum steigert das Wachstum beider Fibroblastenlinien vom 5.-10. Versuchstag um 49-65% im Vergleich zu Normalserum . Zellzahl und Proteingehalt/Zellkulturschale steigen in gleicher Weise parallel zueinander.

Das Wachstum aller untersuchten Fibroblastenlinien von pankreatektomierten Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (n=4) im Vergleich zu den parallel gezüchteten Fibroblastenlinien Stoffwechselgesunder (n=2) ist bis zum letzten Versuchstag serumunabhängig um durchschnittlich 46% gesteigert ($p<0,001$) (Abb.2).

Diabetikerserum (n=6) steigert im Vergleich zu Normalserum (n=6) bis zum letzten Versuchstag das Wachstum aller Fibroblastenlinien der pankreatektomierten Diabetiker um durchschnittlich 36% ($p<0,025$) (Abb. 3).

Die Fibroblasten der pankreatektomierten Diabetiker mit schlechter Stoffwechseleinstellung zeigen gleiches Wachstum wie die Fibroblasten der primären, insulinpflichtigen Diabetiker mit schlechter Stoffwechseleinstellung, sowohl in Diabetikerserum als auch in Normalserum, wie die repräsentativen

Wachstumskurven der parallel gezüchteten Fibroblastenlinien eines pankreatektomierten Diabetikers (sDF), eines primären Diabetikers (DF) und eines Stoffwechselgesunden (NF) belegen (Abb. 4).
Dagegen zeigt die Fibroblastenlinie eines pankreatektomierten Diabetikers mit optimaler Stoffwechseleinstellung seit Diabetesdiagnose in Diabetikerserum wie in Normalserumgleiches Wachstum wie die Fibroblastenlinie eines altersgleichen Stoffwechselgesunden (Abb. 5).

Auch die Fibroblastenlinie eines primären Diabetikers mit optimaler Stoffwechseleinstellung seit Diabetesdiagnose zeigt gleiches Wachstum wie die Fibroblasten eines Stoffwechselgesunden (Abb. 6).

Proteinsynthese in Fibroblasten von Diabetikern und Stoffwechselgesunden: Einbau von ^{14}C-Leucin und ^{14}C-Prolin in Zellproteine.

Der Einbau von ^{14}C-Leucin und ^{14}C-Prolin in Zellproteine nach 20 Stunden Inkubation nimmt bei allen in Diabetikerserum und in Normalserum gezüchteten Fibroblastenlinien von Diabetikern (n=5) und Stoffwechselgesunden (n=4) mit zunehmender Zelldichte signifikant ab (Abb. 7a-b). Dabei ist zwischen Fibroblasten von Diabetikern (n=5) und von Stoffwechselgesunden (n=4) unter vergleichbaren Bedingungen kein Unterschied beim Einbau von ^{14}C-Leucin und ^{14}C-Prolin in Zellproteine nachweisbar.

Diabetikerserum steigert den ^{14}C-Leucin-Proteineinbau im Vergleich zu Normalserum bereits nach 4 Stunden um durchschnittlich 37% und nach 20 Stunden um

durchschnittlich 40% ($p<0,05$) (Tab. 5). Der Einbau von ^{14}C-Leucin in zellständiges Protein ist in Diabetikerserum im Vergleich zu Normalserum nach 4 Stunden um durchschnittlich 24% und nach 20 Stunden um durchschnittlich 33% gesteigert ($p<0,0025$). Dagegen unterscheidet sich der Diabetikerserumeffekt nicht vom Normalserumeffekt auf den ^{14}C-Leucin Einbau in extrazellulär abgegebene Proteine nach 4 wie nach 20 Stunden (Tab. 6).

Diabetikerserum steigert in ähnlicher Weise auch den Einbau von ^{14}C-Prolin in Zellproteine nach 4 Stunden um 20% und nach 20 Stunden um 36% ($p<0,025$). Dabei ist ebenfalls kein Unterschied bei dem ^{14}C-Prolin Einbau in extrazellulär abgegebene Proteine im Vergleich zum Normalserumeffekt nachweisbar (Tab. 5-6).

Diabetikerserum führt damit gleichzeitig im Vergleich zu Normalserum zu einer signifikant geringeren Abgabe von neu synthetisierten Proteinen, wie aus dem um 11-23% höheren Quotienten von zellständig neu synthetisierten zur extrazellulären Menge dieser Proteine hervorgeht (Tab. 7)

Da diese mit Diabetikerserum gezüchteten Fibroblasten im Vergleich zum Normalserumeffekt nach 4 bzw. 20 Stunden eine etwa gleich große Proteinmenge extrazellulär abgeben, handelt es sich um eine relative Verminderung der Proteinabgabe. Dies belegen repräsentative Beispiele zum Einbau von ^{14}C-Leucin und ^{14}C-Prolin (Abb 8a-b).

Diskussion

Bedeutung zellulär fixierter Wachstumsänderungen

Das veränderte Wachstumsverhalten von Fibroblasten primärer und sekundärer Diabetiker in der Zellkultur ist Ausdruck zellassoziierter Faktoren.

Zellulär fixierte, in der Zellkultur über viele Passagen erhaltene Veränderungen des Wachstums mesenchymaler Zellen werden in Beziehung zur Zellalterung gebracht. So korreliert die Teilungsfähigkeit von Fibroblasten zum Höchstalter der jeweiligen Art (3,4). Bereits vor dem Ende der Vermehrungsfähigkeit treten funktionelle und morphologische Veränderungen auf, die als Ausdruck der Zellalterung angesehen werden und zu den Alterungsvorgängen des Gesamtorganismus in Beziehung gesetzt werden (2). In der Zellkultur äußern sich diese Altersänderungen z.B. in einer größeren Latenzzeit beim Auswachsen aus den Originalgewebsstückchen, einer Verzögerung bei der Verdopplung der Zellzahl und einer verminderten Bereitschaft zum Wiederanwachsen nach Isolierung aus dem Zellverband mittels proteolytischer Enzyme (5). Die genauen Mechanismen der Wachstumsregulation der Zelle sind noch unbekannt.

Die Teilungsfähigkeit menschlicher Fibroblasten ist auf ungefähr 50 Verdopplungen der Zellzahl beschränkt (2). Somit wird eine kurzfristige Beschleunigung der Verdopplung der Zellzahl besonders stimulierbarer Zellstämme langfristig zu einer verringerten Teilungsfähigkeit der verbleibenden Zellpopulationen führen, die ihre limitierte Verdopplungskapazität schneller aufbrauchen.

So ist das vorzeitige Auftreten von Arteriosklerose beim Diabetes mellitus als Ausdruck der vorzeitigen Alterung von mesenchymalen Arterienwandzellen gedeutet worden (1,2). Eine beschleunigte Zellumsatzrate mit vermehrt anfallenden degenerierten toten Zellen und rasch proliferierenden Ersatzzellen ist beim Diabetes mellitus als Ursache für eine vorzeitige Verdickung der Basalmembranen in verschiedenen Geweben wie Niere, Lunge, ZNS, Gefäßkapillaren beschrieben worden (12,13).

Ein Beleg für diese Hypothese ist auch eine Verminderung der Zellteilungsfähigkeit, der Aussaateffizienz, der Zellzahl bei Konfluenz und eine verzögerte Verdopplungszeit bei in vitro gezüchteten Diabetikerfibroblasten im Vergleich zu Normalfibroblasten (5). Bereits an Fibroblasten genetischer Prädiabetiker fand man Einschränkungen der Teilungsfähigkeit (6). Kein Unterschied fand man beim Fibroblastenwachstum zwischen Typ I und Typ II Diabetikern (6).

Auch andere, familiär auftretende Krankheiten mit Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels können mit einer Verminderung der Fibroblastenteilungsfähigkeit einhergehen, wie z.B. bei der Huntingtonschen Krankheit, beim Hutchinson-Gilford- und Werner Syndrom (2), die als Modelle für beschleunigtes Altern angesehen werden.

Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme einer genetischen Prädisposition mit verändertem Wachstumsverhalten von mesenchymalen Diabetikerzellen.

Im Gegensatz dazu stehen Untersuchungen an Diabetikerfibroblasten von Pima Indianern und von 4 Kindern kaukasischer Rasse, deren Wachstum sich nicht von altersgleichen Kontrollen unterscheidet. Allerdings ist das Fibroblastenwachstum der nicht

diabetischen Pima Indianer reduziert im Vergleich zum Fibroblastenwachstum von Personen kaukasischer Rasse (14).

Dagegen zeigen Prä- und Adipozyten von übergewichtigen Typ II Diabetikern eine signifikant erhöhte Proliferationsrate und Lipogenese im Vergleich zu Adipozyten übergewichtiger Stoffwechselgesunder. Die erhöhte Proliferationsrate korreliert nur zur diabetischen Stoffwechsellage und nicht zum Übergewicht, da sie ausschließlich in Adipozyten von Diabetikern nachweisbar ist (15).

Ebenso wurde an mesenchymalen Zellen von Patienten mit familiärer Diabetesbelastung und schlechter Stoffwechseleinstellung über lange Zeit eine zellulär fixierte, in der Zellkultur bis zur 10 Passage konstante Erhöhung der Proliferationsrate nachgewiesen (22)

Die bisher beschriebenen Wachstumsänderungen mesenchymaler Zellen existieren unabhängig vom Einfluß extrazellulärer metabolischer Faktoren, wobei diese Ergebnisse offen lassen, ob sich dabei ein diabetesspezifischer Gendefekt manifestiert, oder ob in vivo diabetesspezifische metabolische Faktoren ebenfalls von Bedeutung sind.

Zellulär fixierte Wachstumsänderungen und die Bedeutung metabolischer Faktoren bei verschiedenen Tierzpezies im Vergleich zum Menschen.

Die Bedeutung der Interaktion genetisch prädisponierter mesenchymaler Zellen mit extrazellulären Faktoren geht aus Wachstumsuntersuchungen an arteriellen glatten Muskelzellen von Ratten, Kaninchen und Minischweinen hervor. Bei den stoffwechselgesunden Tieren wurde

experimentell ein Insulinmangeldiabetes (Streptozotozin) induziert. 2-6 Wochen danach zeigte sich in der Gefäßwand eine erhöhte Proliferation von Endothel- und glatten Muskelzellen (7). Auch in der nachfolgenden Zellkultur persistierte eine gegenüber unbehandelten Kontrollen signifikant erhöhte Proliferation der glatten Muskelzellen und zwar unabhängig davon, daß das Inkubationsmedium wieder normalisiert war. Da eine genetische Änderung der Zellen nicht angenommen wurde, war am wahrscheinlichsten, daß Selektionsmechanismen bedeutsam waren. Die Autoren gingen dabei davon aus daß aus einer heterogenen Zellpopulation diejenigen Zellen bevorzugt auswachsen, deren Wachstum durch diabetische Serumfaktoren besonder stimulierbar ist. Auch die Möglichkeit, die gesteigerte Proliferationsrate arterieller glatter Muskelzellen der Ratte durch gleichzeitige in vivo Gabe von proliferationshemmenden Substanzen zu unterdrücken, deutet auf einen solchen Selektionsmechanismus hin (7).

Die Untersuchungsergebnisse an Fibroblasten pankreatektomierter Diabetiker ohne familiäre Diabetesbelastung sind mit dem Tiermodell in folgenden Punkten vergleichbar:

1. Ein durch einen einmaligen externen Eingriff erworbener Insulinmangeldiabetes ohne erkennbare genetische Vorbelastung und eine relativ kurze Diabetesdauer mit schlechter Stoffwechseleinstellung über 1½-2½ Jahre führt in der Zellkultur zur Persistenz einer signifikant erhöhten Proliferationsrate mesenchymaler Zellen über mehrere Passagen unabhängig von einer vollständigen Normalisierung des extrazellulären Milieus über mehrere Wochen.
2. Die Fibroblasten von einem pankreatektomierten wie einem primären Typ I Diabetiker, deren Stoffwechsel durch aktive und dauerhafte Therapie seit Diabetesdiagnose gut eingestellt ist, zeigen ein normales Wachstumsverhalten.

Mitogene Eigenschaften von Diabetikerserum

Im Vergleich zu Seren von Stoffwechselgesunden stimulieren Seren von Typ II Diabetikern, deren Stoffwechsel schlecht eingestellt ist, in der Zellkultur das Fibroblastenwachstum von primären Diabetikern mit familiärer Diabetesbelastung, von pankreatektomierten Diabetikern und von Stoffwechselgesunden in gleicher Weise. Im Gegensatz dazu unterscheiden sich Seren von Typ II Diabetikern mit guter Stoffwechseleinstellung nicht von Seren Stoffwechselgesunder in ihrer wachstumsstimulierenden Wirkung auf menschliche Fibroblasten (22).
Diese Ergebnisse belegen eine zusätzliche mitogene Potenz im Serum von Typ II Diabetikern, die abhängig ist von der Güte der Stoffwechseleinstellung.

Bisher ist nicht bekannt, ob die zusätzliche wachstumsstimulierende Wirkung des Diabetikerserums allein durch quantitative Veränderungen im Serum Stoffwechselgesunder vorhandener Substanzen oder stoffwechselabhängig neu gebildeter Substanzen hervorgerufen werden. Neuere Untersuchungen zeigen die besondere Bedeutung einer niedermolekularen Diabetikerserumfraktion (MG<3500 Daltons), die alleine aber noch keine Wachstumssteigerung bedingen kann, sondern erst im Zusammenwirken mit der nicht diabetesspezifischen höhermolekularen Serumfraktion (MG>3500 Daltons) wirksam wird (23). Die genaue Natur der niedermolekularen Serumfraktion ist aber noch nicht bekannt.

Obwohl die niedermolekulare Serumfraktion alleine das Wachstum mesenchymaler Zellen noch nicht erhöht, könnte aber in den Zellen eine Prädisposition zu erhöhter Ansprechbarkeit gegenüber anderen extrazellulären Faktoren geschaffen werden, die sich

nicht nur auf den Wachstumsbereich, sondern auch auf andere zelluläre Stoffwechselaspekte auswirken könnte. Erst durch das Zusammenwirken mit höhermolekularen Serumfaktoren würde die gesteigerte Wachstumsbereitschaft realisiert.

Diese Ergebnisse weisen auch beim menschlichen Diabetes auf die Möglichkeit hin, daß extrazelluläre Faktoren ähnlich wie beim tierexperimentellen Diabetes zumindest als Manifestationsfaktor dauerhafte strukturelle Änderungen von Geweben bewirken, wie sie für die Frühphase der Atherogenese charakteristisch sind. Dabei könnten diabetische genetische Faktoren von Bedeutung sein z.B. durch Selektion von mesenchymalen Zellen mit gesteigerter Wachstumsbereitschaft und mit möglicherweise noch anderen veränderten Stoffwechseleigenschaften.

Änderung der Proteinsynthese mesenchymaler Zellen

Die enge Beziehung zwischen Wachstum und Proteinstoffwechsel wird dadurch unterstützt, daß bei allen Fibroblastenlinien serumunabhängig eine linear positive Korrelation zwischen Zellzahl und Proteingehalt und eine linear negative Korrelation zwischen Proteinsynthese/Zelle und Zelldichte besteht (24). Während bei den vorliegenden Untersuchungen kein Unterschied zwischen Diabetikerfibroblasten und Normalfibroblasten beim Einbau von ^{14}C-Leucin und ^{14}C-Prolin in zelluläre Proteine nachweisbar war, zeigten detailliertere Analysen anderer Autoren die Bildung abnormer Kollagene bei normaler Gesamtproteinsynthese (8). In anderen Diabetikerfibroblasten wurde auch eine gesteigerte Synthese normaler Proteine und abnormaler Glykoproteine nachgewiesen (8,9,15). Dies wurde in Bezeihung gesetzt zur Akkumulation extrazellulärer Bindegewebs-

substanzen und zu den für die diabetischen Angiopathien charakteristischen Alterungsprozessen (17).

Die Bedeutung der Faktoren des Diabetikerserums zeigt sich unabhängig vom Zelltyp an einer signifikanten Steigerung des ^{14}C-Prolin- bzw. ^{14}C-Leucineinbaus in neu synthetisierte Proteine um 30-40%. Im Verhältnis zur Gesamtmenge der neu synthetisierten Proteine ist der Austritt solcher Proteine in den extrazellulären Raum vermindert. Es ist möglich, daß dieser Unterschied auf der unterschiedlichen Stimmulation der Synthese verschiedener Proteine beruht, oder daß Diabetikerserum den Proteinaustritt aus der Zelle gleichfalls beeinflußt.

Aus Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen ist bekannt, daß Insulin, Glukose, Ketone, Wachstumshormon die Proteinsynthese von gezüchteten aortalen glatten Muskelzellen beeinflussen können (18). Glukose steigert in menschlichen Fibroblasten konzentrationsabhängig zwischen 100 und 700 mg/dl die Synthese und Sekretion abnormen Kollagens (19). Auch Serum von Patienten mit Hypercholesterinämie und von hypercholesterinämischen Ratten steigert in vitro die Kollagensynthese (20). In der arteriosklerotischen Aortenwand von hypercholesterinämischen Ratten ist die Gesamtprotein- Kollagen- und Elastinsynthese erhöht und führt zu einer vermehrten Ablagerung extrazellulärer Bindegewebssubstanzen (21,22). Diese Ergebnisse können insofern von Bedeutung sein, als die Serumspiegel von Glukose, Cholesterin und Insulin bei den verwendeten Diabetikerseren erhöht sind.

Zusammenfassung

Faktoren, die zur Pathogenese der diabetischen Angiopathien beitragen können, wurden unter Zellkulturbedingungen untersucht. Dabei sind von Interesse:

a) zellgebundene Änderungen des Wachstums mesenchymaler Zellen
b) Veränderungen im Diabetikerserum, die das Zellwachstum und die Proteinsynthese beeinflussen.

Zur Klärung der Bedeutung zellulär fixierter Faktoren für abnormes Wachstumsverhalten mesenchymaler Zellen beim Diabetes mellitus wurde das Fibroblastenwachstum von pankreatektomierten Diabetikern ohne familiäre Diabetesbelastung (sDF) mit dem Fiabrboastenwachstum von primären Diabetikern mit familiärer Diabetesbelastung (DF) und von Stoffwechselgesunden (NF) verglichen. Der Proteinstoffwechsel wurde hinsichtlich seiner Abhängigkeit von zellassoziierten und metabolischen Faktoren untersucht.

Fibroblasten pankreatektomierter Diabetiker zeigen gleiches Wachstum wie Fibroblasten primärer insulinpflichtiger Diabetiker. Dabei ist das Wachstum aller untersuchten Fibroblastenlinien von pankreatektomierten Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (n=4) im Vergleich zum Fibroblastenwachstum altersgleicher Stoffwechselgesunder (n=2) um durchschnittlich 45% gesteigert. Im Gegensatz dazu unterscheidet sich das Fibroblastenwachstum eines pankreatektomierten Diabetiekrs und eines primären Typ II Diabetikers, deren Stoffwechsel seit der Diabetesmanifestation gut eingestellt war, nicht vom NF Wachstum.
Es zeigt sich somit eine zellulär fixierte Steigerung der Wachstumsfähigkeit mesenchymaler Zellen beim

sekundären Diabetes mellitus, die in Abhängigkeit vom Ausmaß der Stoffwechselstörung in vivo manifest wird.

Diabetikerserum steigert im Vergleich zu Normalserum das Wachstum aller untersuchten Fibroblastenlinien pankreatektomierter Diabetiker um durchschnittlich 36%.

Diabetikerserum steigert die Proteinsynthese gemessen am ^{14}C-Leucin bzw. ^{14}C-Prolineinbau in zellständige Proteine nach 20 Stunden um 33% bzw. 36%. Dagegen findet sich kein Unterschied der DS und NS Wirkung auf den Einbau dieser Aminosäuren in extrazellulär abgegebene Proteine, wie aus dem um 11-23% höheren Quotienten zellständiges Protein/extrazelluläres Protein hervorgeht.
Mit zunehmender Zelldichte nimmt der Einbau von ^{14}C-Leucin und ^{14}C-Prolin in Protein/Zelle unabhängig vom Zelltyp linear ab.

Das bei Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung unabhängig vom Diabetestyp gesteigerte Fibroblastenwachstum steht in Einklang mit der Hypothese, daß Wachstumsfaktoren im Blut von Diabetikern zu einer Selektion von Zellen mit einer erhöhten Wachstumsbereitschaft gegenüber diesen Faktoren führen. Das unveränderte Wachstumsverhalten von Diabetikerfibroblasten mit optimaler Stoffwechseleinstellung seit Diabetesmanifestation kann dadurch erklärt werden, daß deren Seren keine zusätzlichen, das Zellwachstum stimulierenden Faktoren enthalten.

Die gesteigerte Proteinsynthese von in Diabetikerserum gezüchteten Fibroblasten steht in Einklang mit der von anderen Autoren beschriebenen erhöhten Ablagerung extrazellulärer Bindegewebssubstanzen (17), was u.a. charakteristisch für die arteriosklerotischen Läsionen ist.

Tab. 1

Konzentrationsbereiche verschiedener Serumbestandteile (IGF: insulin like growth factor)

1) von nicht ketotischen Typ II Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (NIDDM/DS) (n=6)
1) von Stoffwechselgesunden (Kontrollen/NS) (n=6)

	Glukose mg/dl	Cholesterin mg/dl	Triglyceride mg/dl	Insulin µU/ml	IGF I ng/ml	IGF II ng/ml	STH ng/ml
NIDDM (n=6)	205-245	180-215	218-249	22-34	122-255	700-770	2,0-3,$
Kontrollen (n=6)	90-100	142-159	42-104	7-14	102-228	620-700	2,0-4,♀

Tabelle 2

Zellinien (Hautfibroblasten) von Pankreatektomierten mit sekundärem insulinpflichtigem Diabetes mellitus (s. D) nach totaler Pankreatektomie

	Geschlecht	Alter (Jahre)	Vorerkrankung	s.D - Dauer (Jahre)	Famil. D - Belastung	s.D.-Langzeit-einstellung	s.D-Spät-schäden
1	m	41	Pankreatitis	2	nein	schlecht	keine
2	m	42	Pankreatitis	2	nein	schlecht	keine
3	m	44	Pankreatitis	2 1/2	nein	schlecht	keine
4	m	45	Pankreaskrebs	1 1/2	nein	schlecht	keine
5	m	48	Pankreatitis	3 1/2	nein	optimal	keine

Tabelle 3

Zellinien (Hautfibroblasten) von Patienten mit primärem Diabetes mellitus (D)

	Geschlecht	Alter (Jahre)	D - Typ	D-Dauer (Jahre)	Familiäre D - Belastung	D - Langzeiteinstellung	D- Spätschäden
1	w	10	IDDM	1	ja	schlecht	keine
2	w	17	IDDM	3	ja	schlecht	keine
4	w	25	NIDDM	2	ja	optimal	keine

Tabelle 4

Zellinien (Hautfibroblasten) von Stoffwechselgesunden (NF)

	Geschlecht	Alter (Jahre)
1	m	22
2	m	33
3	m	44
4	m	49

Tab. 5

Zusätzlicher Effekt von Diabetikerserum (n=3) im Vergleich zu Normalserum (n=2) auf den ^{14}C-Leucin- bzw. ^{14}C-Prolineinbau (CPM/10^6 Zellen) in Proteine bei Fibroblasten von Diabetikern und Stoffwechselgesunden (n=9) nach 4 bzw. 20 Stunden Inkubation mit ^{14}C-Leucin bzw. ^{14}C-Prolin (0,5 µCi/ml) bei 37°C.

$\bar{X} \pm$ SEM
x $p<0,05$ xx $p<0,025$

Angegeben ist die zusätzliche Einbaurate in % bei Inkubation in DS (Einbaurate in NS = 100%).

	^{14}C-Leucin	^{14}C-Prolin
	Gesamtprotein	Gesamtprotein
4 Stunden	37 ± 10	20 ± 28
20 Stunden	40 ± 10^{x}	36 ± 25^{xx}

Tab. 6

Zusätzlicher Effekt von Diabetikerserum (n=3) im Vergleich zu Normalserum (n=2) auf den ^{14}C-Leucin- bzw. ^{14}C-Prolineinbau (CPM/10^6Zellen) in zelluläre bzw. extrazellulär abgegebene Proteine bei Fibroblasten von Diabetikern und Stoffwechselgesunden (n=9) nach 4 bzw. 20 Stunden Inkubation mit ^{14}C-Leucin bzw. ^{14}C Prolin (0,5 µCi/ml) bei 37°C.

$\bar{X} \pm$ SEM
x $p<0,01$ xx $p<0,025$ xxx $p<0,0025$

Angegeben ist die zusätzliche Einbaurate in % bei Inkubation in DS (Einbaurate in NS = 100%).

	^{14}C-Leucin		^{14}C-Prolin	
	zellständiges Protein	extrazelluläres Protein	zellständiges Protein	extrazelluläres Protein
4 Stunden	24 ± 12^{x}	13 ± 8	14 ± 16	6 ± 12
20 Stunden	33 ± 12^{xxx}	7 ± 8	27 ± 15^{xx}	9 ± 10

Tab. 7

Effekt von Diabetikerserum (n=3) im Vergleich zu Normalserum (n=2) auf das Verhältnis von ^{14}C-Leucin- bzw. ^{14}C-Prolineinbau (CPM/10^6 Zellen) in zelluläre Proteine zur extrazellulär abgegebenen Menge dieser Proteine, bei Fibroblasten von Diabetikern und Stoffwechselgesunden (n=9) nach 4 bzw. 20 Stunden Inkubation mit ^{14}C-Leucin bzw. ^{14}C-Prolin (0,5 µCi/ml) bei 37°C.

$\bar{X} \pm$ SEM
x $p<0,05$ xx $p<0,005$ xxx $p<0,001$

Angegeben ist der Quotient zellulärer/extrazellulärer Proteineinbau von ^{14}C-Leucin bzw. ^{14}C-Prolin.

	^{14}C-Leucin			^{14}C-Prolin		
	DS	NS	Δ %DS/NS	DS	NS	Δ %DS/NS
Stunden	$4,23 \pm 0,23^{x}$	$3,80 \pm 0,19$	11,3	$2,45 \pm 0,12$	$2,32 \pm 0,14$	5,6
Stunden	$3,45 \pm 0,15^{xxx}$	$2,80 \pm 0,16$	23,2	$1,43 \pm 0,08^{xx}$	$1,22 \pm 0,07$	17,2

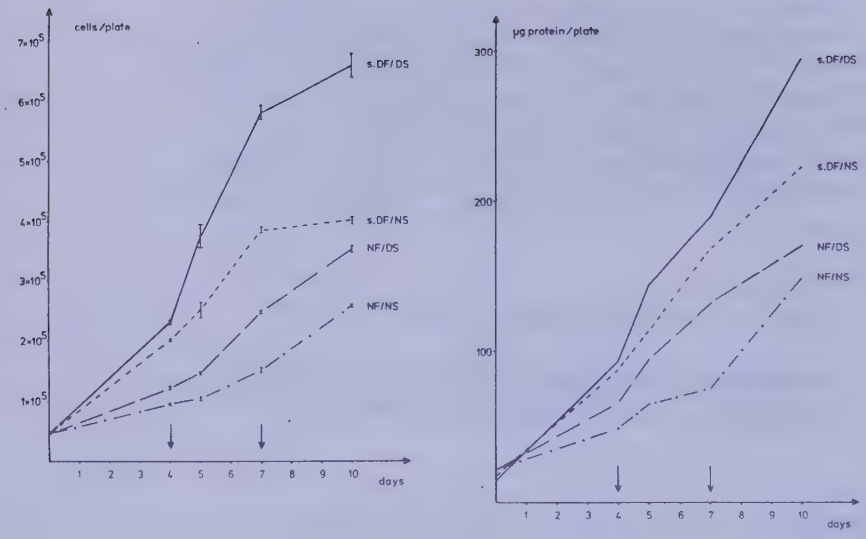


Abb. 1

Fibroblastenwachstum von einem insulinbedürftigen, normgewichtigen, pankreatektomierten Diabetiker mit schlechter Stoffwechseleinstellung (sDF) und einem gleichaltrigen stoffwechselgesunden (NF) in DME + 10% Diabetikerserum (DS) oder Normalserum (NS).

↓ Wechsel des Inkubationsmediums
I Mittelwert ± SEM

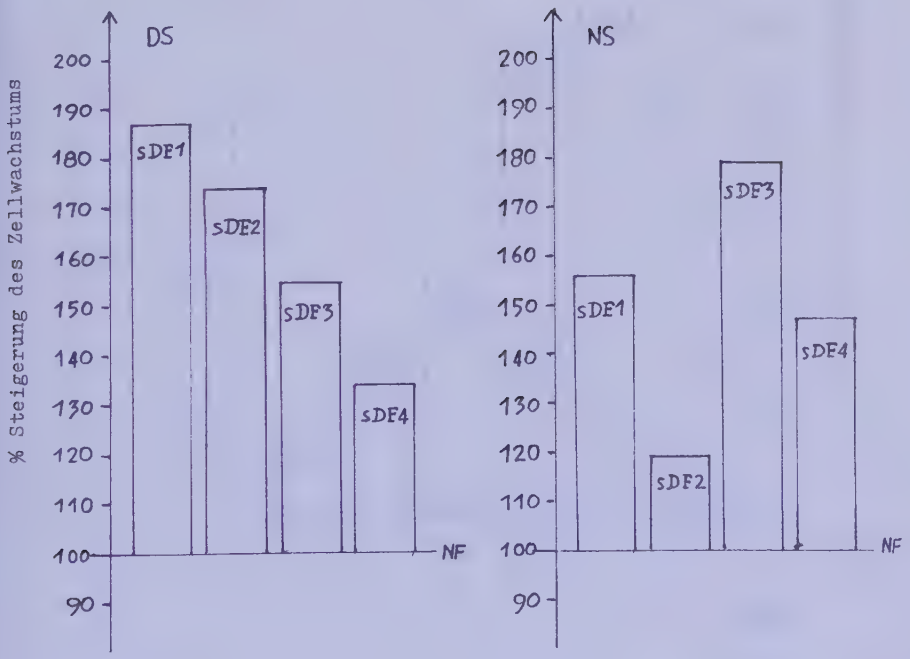


Abb. 2a

Abb. 2b

Zusätzlicher prozentualer Anstieg der Fibroblastenzahl von 4 pankreatektomierten Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (sDF) im Vergleich zu Fibroblasten von 3 Stoffwechselgesunden aus der vergleichbaren Altersgruppe, die parallel mit DME + 10% Diabetikerserum (Abb2a) oder DME + 10% Normalserum (Abb2b) 6-7 Tage gewachsen sind.

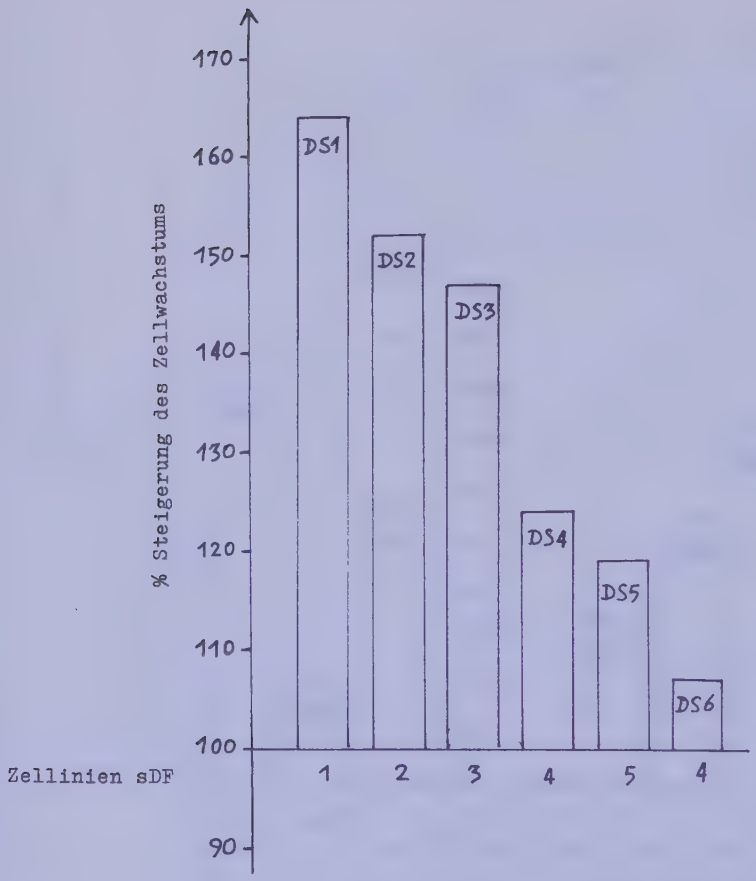


Abb. 3

Wachstumseffekt von 6 Mischseren nicht insulinbedürftiger Diabetiker mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS, n=6) auf das Fibroblastenwachstum im Vergleich zum Wachstumseffekt von Normalserum (=100%) (NS, n=6). Gemessen wurde das Fibroblastenwachstum von 5 pankreatektomierten Diabetikern (sDF) am 6.-10. Versuchstag.

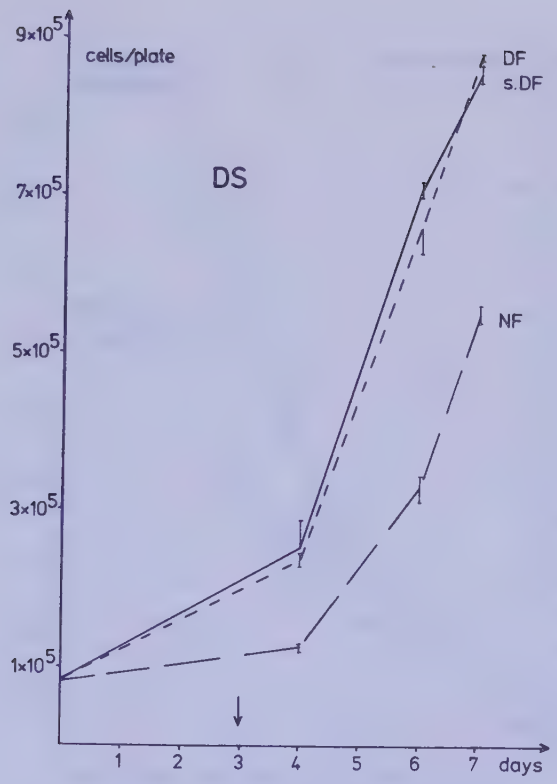


Abb. 4

Fibroblastenwachstum von einem normgewichtigen, insulinbedürftigen, pankreatektomierten Diabetiker mit schlechter Stoffwechseleinstellung (sDF), einem altersgleichen nicht insulinpflichtigen primären Diabetiker mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DF) und einem gleichaltrigen Stoffwechselgesunden (NF) in DME + 10% Diabetikerserum (DS).

↓ Wechsel des Inkubationsmediums
I Mittelwert ± SEM

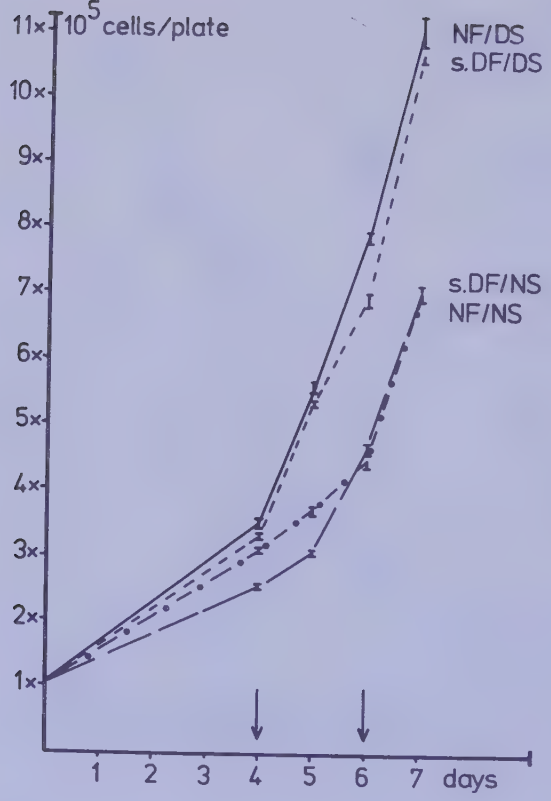


Abb. 5

Fibroblastenwachstum eines normgewichtigen, insulinbehandelten, pankreatektomierten Diabetikers mit optimaler Stoffwechseleinstellung seit Pankreatektomie (sDF) und eines gleichaltrigen Stoffwechselgesunden (NF) in DME + 10% Diabetikerserum (DS) bzw. Normalserum (NS).

↓ Wechsel des Inkubationsmediums
I Mittelwert ± SEM

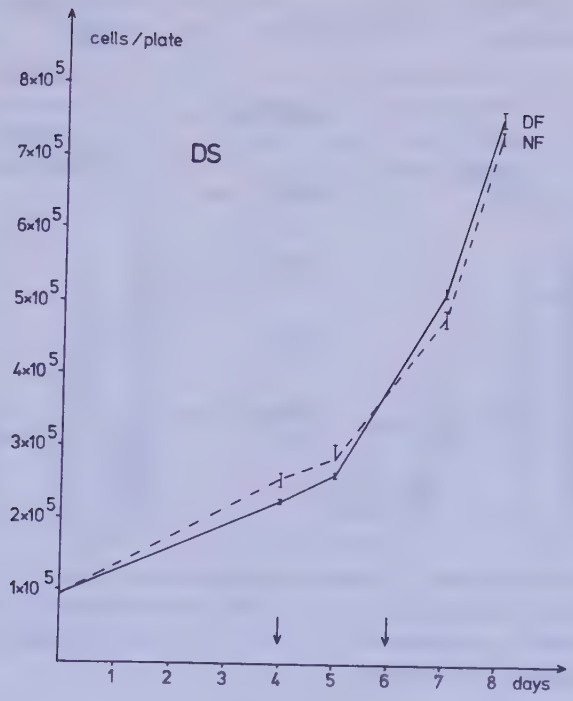
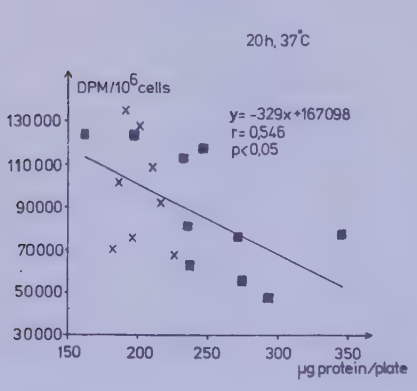


Abb. 6

Fibroblastenwachstum eines normgewichtigen, nicht insulinbedürftigen Diabetikers mit optimaler Stoffwechseleinstellung seit Erstmanifestation (DF) und eines gleichaltrigen Stoffwechselgesunden (NF) in DME + 10% Diabetikerserum (DS).

↓ Wechsel des Inkubationsmediums
I Mittelwert ± SEM

^{14}C-Leucin Protein Einbau
in Fibroblasten



^{14}C-Prolin Protein Einbau
in Fibroblasten

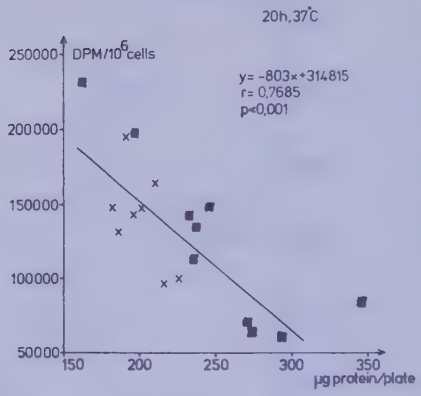


Abb. 7a

Abb. 7b

Korrelation des Einbaus von ^{14}C-Leucin (0,5 µCi/ml) (Abb. 7a) und ^{14}C-Prolin (0,5 µCi/ml) (Abb. 7b) in TCA fällbare Proteine in Fibroblasten von 4 Diabetikern (x) und 5 Stoffwechselgesunden (x) zum Proteingehalt (µg/Platte).

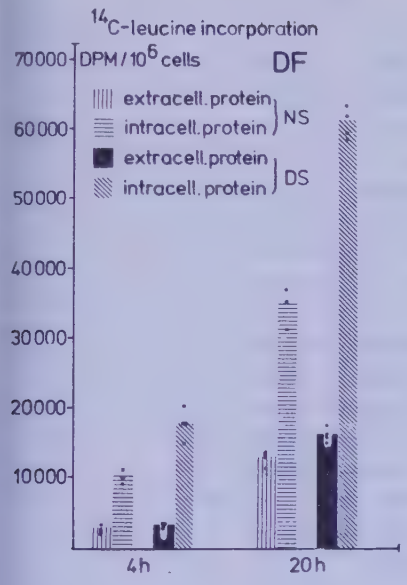


Abb. 8a

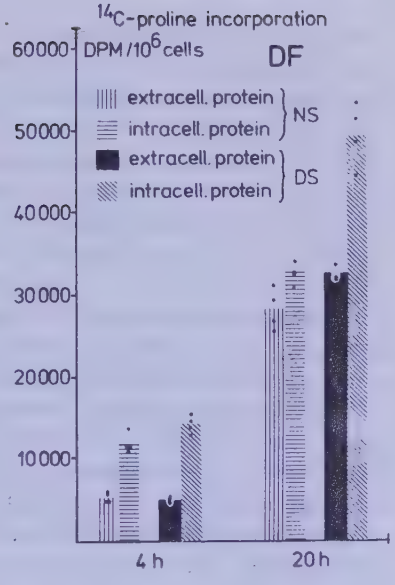


Abb. 8b

Einbau von ^{14}C-Leucin (0,5 µCi/ml) (Abb. 8a) und ^{14}C-Prolin (0,5 µCi/ml) (Abb. 8b) in zelluläre und extrazelluläre Proteine (DPM/10^6 Zellen) nach 4h und 20h bei 37°C in Fibroblasten eines Diabetikers (DF), die parallel in DME + 10% Serum von Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS) bzw. von Stoffwechselgesunden (NS) gezüchtet wurden.

Literaturverzeichnis

1. Ross, R., Glomset, J.A.,
The pathogenesis of atherosclerosis
New Eng. Jour. Med. 295 No7 369 (1976)
2. Hayflick, L.,
The cell biology of human aging
New Engl Jour. Med. 295, 1302, (1976)
3. Merz, G.S., Ross, J.D.,
Viability of human diploid cells as a function of in vitro age
J. Cell. Physiol. 74, 219-222, (1969)
4. Martin, G.M., Sprague, C.A., Epstein, C.J.,
Replicative live span of cultivated human cells.
Effect of donor's age, tissue and genotype.
Lab. Invest. 23,1, 86, (1970)
5. Goldstein, S., Littlefield, J.W., Soeldner, J.S.
Diabetes mellitus and aging: diminished plating efficiency of cultured human fibroblasts.
Proc. Nat. Sci. USA 64, 155, (1969)
6. Goldstein, S., Moerman, E.,
Diabetes mellitus and genetic prediabetes. Decreased replicative capacity of cultured skin fibroblasts.
J. Clin. Invest. 63, 358, (1979)
7. Hauss, W.H., Mey, J., Schulte, H.,
Effect of risk factors and antirheumatic drugs on the proliferation of aortic wall cells.
Atherosclerosis 34, 119-143, (1979)
8. Rowe, D.W., Starman, B.J., Fujimoto, W.Y., Williams, R.H.,
Abnormalities in proliferation and protein synthesis in skin fibroblast cultures from patients with diabetes mellitus.
Diabetes 26, 284, (1977)
9. Silbert, C.K., Kleinmann, H.K.,
Studies of cultured human fibroblasts in diabetes mellitus. Changes in heparan sulfate.
Diabetes 28, 61, (1979)

10. Dulbecco, R., Freeman, G.,
Virology 8, 396, (1959)
11. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L.,
Randall, R.J.,
Protein measurement with th folin phenol reagent
J. Biol. Chem. 193, 265-275, (1951)
12. Kilo, C., Vogler, N.J., Williamson, J.R.,
Muscle capillary basement membrane changes related
to aging and to diabetes mellitus.
Diabetes 21, 881, (1972)
13. Østerby, R., Gundersen, H.J.G.,
Fast accumulation of basement mambrane material
and the rate of morphological changes in acute
experimental diabetic glomerular hypertrophy.
Diabetologika 18, 493, (1980)
14. Howard, B.V., Fields, R.M., Mott, D.M., Savage, P.J.,
Naguelsparan, m., Bennett, P.H.,
Diabetes and cell growth - lack of differences
in growth characteristics of diabetic and non
diabetic Pima Indians
Diabetes 29, 119, (1980)
15. Waheed, I., Poznanski, W.J.,
Accelerated Lipogenesis and adipose cell proliferation
in culture as factors in human obesity and maturity
onset diabetes mellitus.
Diabetes 29 Suppl.2, 62A, (1980)
16. Williamson, J.R., Chang, K., Uitto, J., Rowald, E.A.,
Grant, G.A., Kilo, C.,
Decreased collagen extrctability in diabetes:
Reversal by ß-aminopropionitrile (BAPN) and
D-penicillamine (D-pen)
Diabetes 29, (suppl. 2), 12A, (1980)
17. Paz, M.A., Gallop, P.M.,
Collagen synthsized and modified by aging fibroblasts
in culture.
In Vitro 11, 5, 302, (1975)

18. Ledet, T., Vuust, J.,
Arterial Procollagen Type I, Type III and Fibronectin. Effects of diabetic serum, glucose, insulin, ketone and growth hormone studied on rabbit aortic myomedial cell cultures.
Diabetes 29, 964, (1980)

19. Villee, D.B., Powers, M.L.,
Effect of glucose and insulin on collagen secretion by human skin fibroblasts in vitro.
Nature 268, 156, (1977)

20. Rönnemaa, T., Doherty, N.S.,
Effect of serum and liver extracts from hypercholesterolemic rats on the synthesis of collagen by isolated aortas and cultured aortic smooth muscle cells.
Atherosclerosis 26, 261, (1977)

21. Fischer, G.M., Swain, M.L.,Cherain, K.,
Increased vascular collagen and elastin synthesis in experimental atherosclerosis in the rabbit.
Atherosclerosis 35, 11, (1980)

22. Koschinsky, T., Bünting, C.E., Schwippert, B., Gries, F.A.,
Increased growth of human fibroblasts and arterial smooth muscle cells from diabetic patients related to diabetic serum factors and cell origin.
Atherosclerosis 33, 245, (1979)

23. Koschinsky, T., Bünting, C., Schwippert, B., Gries, F.A.
Studies on inherited and acquired metabolic disorders in cultured arterial smooth muscle cells and fibroblasts.
Int. J. Obes. 6, Suppl 1, (1982)

24. Koschinsky, T.,
Angeborene und erworbene Stoffwechselstörungen in arteriellen glatten Muskelzellen und Fibroblasten bei Diabetes und Hyperlipoproteinämien.
Habilitationsschrift der Hohen Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

Lebenslauf

Name	Caspari, Margret Anna
Anschrift	Marktstraße 33, 5440 Mayen
Geburtsort und -tag	Mayen, 19. August 1956
Eltern	Josef Jacob und Irmgard Caspari Kaufleute in Mayen
Schulbildung	
1963 - 1966	Volksschule St. Clemens, Mayen
1966 - 1975	staatlich neusprachliches Gymnasium, Mayen, Abschluß Abitur
Studium	
1975 - 1976	Chemie, Universität Bonn
1976 - 1977	Medizin, Université de l'Etat, Mons (Belgien)
1977 - 1982	Medizin, Universität Düsseldorf
1981 - 1982	Praktisches Jahr, Krankenanstalten Neuss, Lukaskrankenhaus
Nov. 1982	Staatsexamen und Approbation als Ärztin
seit Dez. 1982	Assistenzärztin in der Abteilung für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des St. Marienhospitals Düren Birkesdorf

Margret Caspari

FOTODRUCK J. MAINZ GmbH
Neupforte 13, Nähe Markt, D-5100 Aachen
Telefon: (0241) 27305 und (0241) 38606